

(c)1997 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008629835 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 91-133865/199119

Determin. of spatial distribution of metabolites in tissue samples - by bio-luminescence, using conc. viscous soln. of luciferase and counting photons in unit area

Patent Assignee: MULLER-KLIESER W (MULL-I)

Inventor: MULLERKILE W; WALENTA S

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 3935974	A	19910502	DE 3935974	A	19891028		199119 B

Priority Applications (No Type Date): DE 3935974 A 19891028

Abstract (Basic) DE 3935974 A

Determin. of the spatial distribution of metabolites in tissue samples by bioluminescence, by treating the sample with luciferase soln. and opt. another enzyme soln., and counting the photons/unit of surface of the tissue sample, using a photon-counter and a video camera, an enzyme soln. with high luciferase concn. and high viscosity is used.

The enzyme soln. has luciferase concn. of 0.1-20 (8-12) mU/ml and opt. a gel matrix; it may contain gelatine and/or polyvinylpyrrolidone. The enzyme soln. applied in frozen form, esp. as a thin layer, to the tissue sample, and the temp. is then allowed to rise to just above the dew point of the sandwich so formed. By means of an image processor/integrator for the points of the image surface, with variable time constant for the photon enumeration, a definite time interval is singled out during the whole course of the reaction.

USE/ADVANTAGE - The method can be used to determine distribution of metabolites, e.g. glucose, lactate and adenosine triphosphate (ATP) in tumour tissues. Cross-diffusion or inter-flowing of enzymes and substances to be determined is avoided, as is diffusion of light by gas bubbles in the enzyme layer. The photon-emitting chemical reactions are much more rapid, giving quicker tissue analysis. (6pp Dwg.No.1/1)

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ ⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ ⑯ DE 39 35 974 A 1

⑯ ⑯ Int. Cl. 4  
⑯ ⑯ C 12 Q 1/06  
⑯ ⑯ C 12 Q 1/28  
⑯ ⑯ G 02 B 21/28  
⑯ ⑯ G 02 B 21/34

6680

DE 39 35 974 A 1

⑯ ⑯ Aktenzeichen: P 39 35 974 3  
⑯ ⑯ Anmeldetag: 28. 10. 89  
⑯ ⑯ Offenlegungstag: 2. 5. 91

⑯ ⑯ Anmelder:  
Müller-Klieser, Wolfgang, Prof. Dr., 6500 Mainz, DE

⑯ ⑯ Vertreter:  
Weber, D., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Seiffert, K.,  
Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte, 6200 Wiesbaden

⑯ ⑯ Erfinder:  
Müller-Klieser, Wolfgang, Prof. Dr.; Walenta, -  
Stefan, Dipl.-Biol., 6500 Mainz, DE

⑯ ⑯ Verfahren zur Bestimmung von Metaboliten in Gewebeproben, Enzymcocktail und Vorrichtung zu dessen Durchführung

Ein Verfahren zur Bestimmung der örtlichen Verteilung von Metaboliten in Gewebeproben mittels Biolumineszenz durch Behandlung der Gewebeprobe mit Luciferase-Lösung und gegebenenfalls weiterer Enzymlösung und Auszählung der Photonen pro Flächeneinheit der Gewebeprobe mit Hilfe eines Photonenzählers und einer Videokamera ist dadurch gekennzeichnet, daß man Enzymlösung mit einer hohen Luciferasekonzentration und mit einer hohen Viskosität verwendet.

Eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens besitzt ein Lichtmikroskop mit einer Trägerfläche für das Auflegen der Gewebeprobe, einen Photonenzähler und eine Videokamera mit Bildprozessor, sowie eine Einrichtung zur Regelung der Temperatur der Trägerfläche und eine auf der Trägerfläche anzuordnende einseitig offene Gießform für das Einfrieren von Enzymlösung, wobei die Gießform derart dimensioniert ist, daß auf ihrer offenen Seite ein Trägerplättchen mit der Gewebeprobe angeordnet werden kann.

DE 39 35 974 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Messung der örtlichen Verteilung von Metaboliten in Gewebeproben mittels Biolumineszenz durch Behandlung der Gewebeprobe mit Luciferase-Lösung und gegebenenfalls weiterer Enzymlösung und Auszählung der Photonen pro Flächeneinheit der Gewebeprobe mit Hilfe eines Photenzählers und einer Videokamera.

Es ist bekannt, daß in Tumorgeweben Heterogenitäten von Produkten des Zellstoffwechsels auftreten. Derartige Heterogenitäten wurden beispielsweise für Glucose, Lactat und Adenosintriphosphat (ATP) festgestellt. Sie können zur Diagnose von Tumorgeweben verwendet werden, wenn zuverlässige Methoden zur Ermittlung der örtlichen Verteilung der Metaboliten in Geweben vorhanden sind.

Weiterhin ist es bekannt, wie beispielsweise aus "Journal of the National Cancer Institute", Band 80 (1988), Seiten 843 bis 848, die örtliche Verteilung von Metaboliten in Gewebeproben mittels Biolumineszenz zu ermitteln.

Bei früher bekannten Vorrichtungen diente zum Nachweis der Biolumineszenz ein photographischer Film, auf den bei Raumtemperatur im Dunkeln ein Deckgläschchen mit einem Sandwich aus einem Gewebeschnitt und einer gefrorenen Schicht einer Luciferase enthaltenden Enzymlösung unmittelbar aufgebracht wurde. Der photographische Film nimmt das Licht der Biolumineszenz dabei so lange auf, wie dieser Kontakt besteht. Da aber die Biolumineszenz nur dann auftritt, wenn die Temperatur des Sandwichs oberhalb des Tau-punktes liegt, dann aber sofort Querdiffusion und häufig auch Querströmung der zu messenden Stoffe einsetzt, entstehen bei dieser Methode stark gestörte Bilder.

Ein weiterer wesentlicher Störeffekt bei der bekannten Methode beruhte auf der Verwendung von gefrorenen Enzymschichten, die in der Form von Cryostatschnitten aus gefrorenen Blöcken des Enzymcocktails hergestellt wurden. Solchermaßen hergestellte Cryostatschnitte enthielten unvermeidlich Einschlüsse feiner Gasblasen, die zur Lichtstreuung und zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Enzyme in der Grenzfläche zum Gewebeschnitt führten. Diese bekannte Methode erlaubte daher allenfalls relative Messungen mit sehr geringer Ortsauflösung.

Eine Verbesserung ergab die Verwendung einer Videokamera mit Photonenzählern anstelle des photographischen Filmes, weil hierbei gleichzeitig die Biolumineszenz und die Gestalt des Gewebeschnittes beobachtet werden können. Dadurch kann festgestellt werden, ab welchem Zeitpunkt nach dem Auftauen des Cryostatschnittes die Querdiffusion der zu beobachtenden Substanzen quantitativ zum Tragen kommt. Die eigentliche Aufnahmezeit bleibt aber bei dieser Methode häufig zu kurz, um eine statistisch ausreichende Zählrate bei der Photonenzählung zu erzielen.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand nun darin, ein Verfahren zur Bestimmung der örtlichen Verteilung von Metaboliten in Gewebeproben mittels Biolumineszenz zu bekommen, das eine brauchbare örtliche Auflösung gewährleistet. Insbesondere soll durch das erfundungsgemäße Verfahren eine Querdiffusion bzw. ein Auseinanderfließen von Enzymen und zu bestimgenden Stoffen eingeschränkt werden. Vorrangig soll außerdem die Lichtstreuung durch Gasblasen im Enzymschnitt vermieden werden.

Das erfundungsgemäße Verfahren zur Messung der

örtlichen Verteilung von Metaboliten in Gewebeproben mittels Biolumineszenz durch Behandlung der Gewebeprobe mit Luciferase-Lösung und gegebenenfalls weiterer Enzymlösung und Auszählung der Photonen pro Flächeneinheit der Gewebeprobe mit Hilfe eines Photenzählers und einer Videokamera ist dadurch gekennzeichnet, daß man Enzymlösung mit einer hohen Luciferasekonzentration und mit einer hohen Viskosität verwendet.

Die im Vergleich zum Stand der Technik hohe Luciferasekonzentration der Enzymlösung bzw. des Enzymcocktails führt dazu, daß die Photonen emittierenden chemischen Reaktionen in der Gewebeprobe sehr viel schneller als nach dem Stand der Technik ablaufen, so daß eine für die Ermittlung der Verteilung der Metaboliten erforderliche Photonenzahl relativ schnell gebildet wird, bevor eine wesentliche Querdiffusion und Querströmung der zu bestimmenden Stoffe und Enzyme erfolgt. Weiterhin werden die Querdiffusion und Querströmung der Enzyme und zu bestimmenden Stoffe dadurch eingeschränkt, daß die Enzymlösung eine hohe Viskosität besitzt, die Querströmungen behindert. Mit der Kombination beider Merkmale führt das Verfahren zu einer weitgehenden Vermeidung von Querdiffusionen und Querströmungen während einer Reaktionszeit, die ausreicht, genügend Photonen zu bilden, um ein Signal/Rauschverhältnis zu erhalten, das eine zuverlässige Identifizierung der örtlichen Verteilung der Metaboliten in der Gewebeprobe gestattet.

Aufgrund der erfundungswesentlichen Verfahrensmerkmale ist das Biolumineszenzverfahren erstmals geeignet, schnelle Gewebeanalysen in zuverlässiger Weise durchzuführen, um beispielsweise während einer Operation schnell festzustellen, ob ein Gewebe ein Tumorgewebe ist oder nicht.

Wenn hier von einer hohen Luciferasekonzentration die Rede ist, so liegt diese zweckmäßig im Bereich von 0,1 bis 20,0, vorzugsweise im Bereich von 8 bis 12 mU/ml des Enzymcocktails oder der Enzymlösung, wobei eine Konzentration von etwa 10 mU/ml optimal ist.

Hohe Viskosität bedeutet eine Viskosität, bei der die Enzymlösung während der Vorbereitungsphase noch gießfähig ist, während der Meßphase jedoch so fest ist, daß eine Querdiffusion oder Querströmung weitgehend verhindert und gleichzeitig ein ausreichender Kontakt zum Gewebeschnitt hergestellt wird.

Die hohe Viskosität der Enzylösung bzw. der Matrix der Enzylösung kann man durch an sich bekannte Verdickungsmittel erhalten, die in Wasser löslich sind. Beispielsweise können solche Verdickungsmittel verwendet werden, die in wässriger Lösung zu einer gelartigen Matrix führen. Bevorzugte Beispiele solcher Substanzen, die zu erfundungsgemäß brauchbaren hochviskosen Enzylösungen führen, sind Gelatine und/oder Polyvinylpyrrolidon. Thixotrop machende Stoffe sind bekannt und können hier verwendet werden.

Die durch Luciferase katalysierten, Photonen emittierenden und damit Biolumineszenz ergebenden chemischen Reaktionen benötigen eine bestimmte Temperatur und treten im wesentlichen erst oberhalb des Tau-punktes der Enzylösung auf. Wie erwähnt, verstärken sich aber Querdiffusion und Querströmung bei erhöhten Temperaturen schnell, so daß es ein bevorzugtes Merkmal des erfundungsgemäßen Verfahrens ist, die Temperatur so einzustellen, daß die Tauposition des Sandwiches aus Gewebeschnitt und gefrorener Enzylösung gerade überschritten wird und die Temperatur auf dieser Höhe gehalten wird. Auf diese Weise bekommt man

im wesentlichen eine konstante Reaktionstemperatur, bei der die Photonen emittierenden Reaktionen ausreichend schnell ablaufen, ohne daß Querdiffusion und Querströmungen begünstigt werden. Man geht dabei so vor, daß man die Enzymlösung in der Form einer gefrorenen Schicht in Berührung mit dem Gewebeschnitt bringt und die Temperatur anschließend so erhöht, daß die Tautemperatur des gebildeten Sandwiches gerade überschritten wird, wobei man gleichzeitig die Photonenabgabe mißt.

Da trotz der hohen Luciferasekonzentration in der Enzymlösung und trotz der Temperatureinstellung die Reaktion eine gewisse Zeit zum Anlaufen benötigt und nach einer gewissen Zeit doch zu einer Querdiffusion und Querströmung führt, ist es zweckmäßig, aus dem zeitabhängigen Verlauf der Photonenauszählung einen bestimmten Zeitabschnitt herauszunehmen, bei dem eine optimale Reaktionsgeschwindigkeit und gleichzeitig möglichst geringe Querdiffusion und Querströmung auftritt. Dies kann man mit Hilfe eines Bildprozessors mit einer Integrationseinrichtung für die Punkte der Bildfläche, deren Zeitkonstante variabel wählbar ist, erreichen, indem man mit Hilfe dieser Integrationseinrichtung den Zeitabschnitt der Gesamtdauer der Photonenauszählung herausschneidet und für die Bestimmung der Verteilung der Metaboliten in der Gewebeprobe verwendet, in welchem die Photonenemission bereits groß ist, Querdiffusion und Querströmung aber noch klein sind.

Wie eingangs dargelegt wurde, besteht eine bevorzugte weitere Zielsetzung des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, die Störung der Optik durch Einschlüsse kleiner Gasblasen in den gefrorenen Enzyschichten zu vermeiden. Dies kann man vorzugsweise dadurch erreichen, daß man die Enzyschichten nicht von gefrorenen Blöcken der Enzylösung abschneidet, sondern in der erwünschten Schichtdicke gießt. Obwohl dies grundsätzlich auf einer gekühlten ebenen Platte geschehen kann, ist es insbesondere für quantitative Bestimmungen zweckmäßig, die Enzylösungsschicht in einer Gießform herzustellen, in der eine definierte Menge der Enzylösung eingefüllt und eingefroren wird. Günstigerweise besteht die Gießform aus einem kleinen tassenförmigen Behälter, in den die definierte Menge des Enzymcocktails einpippettiert wird, worauf die Gießform in einem Kühlfach eingefroren wird. Im eingefrorenen Zustand können die Gießformen mit der eingefrorenen Enzylösung als Vorrat vorbehalten werden und bei Bedarf dem Kühlfach entnommen werden. Zur Durchführung des Verfahrens wird nun die Gießform mit der gefrorenen Enzylösung darin auf die beheizbare Trägerfläche eines Lichtmikroskops gestellt. Sodann wird ein Deckgläschen mit dem darauf befestigten Gewebeschnitt nach unten unter Bildung eines Sandwichs auf die gefrorene Enzylösungsschicht aufgelegt, worauf durch Erwärmung der Trägerfläche des Lichtmikroskops die Enzylösung aufgetaut wird. Gleichzeitig beginnt die Photonenauszählung und die Speicherung der Auszählungsergebnisse über die Reaktionszeit.

Überraschenderweise wird durch das Gefrieren der Enzylösung in dünner Schicht die Bildung von Gasblasen und der damit verbundene Nachteil von Lichtstreuung und ungleicher Verteilung der Enzyme an der Grenzfläche zum Gewebeschnitt vermieden. Außerdem erleichtert die Verwendung von Gießformen für die Enzylösung eine beschleunigte Durchführung des Verfahrens, wie sie etwa zur Tumorbestimmung während operativer Eingriffe erforderlich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die Bestimmung der örtlichen Verteilung von Glucose, Lactat oder ATP in Gewebeschnitten brauchbar, doch ist die Anwendbarkeit nicht hierauf beschränkt. Grundsätzlich können mit diesem Verfahren alle Metaboliten bestimmt werden, die an das Redoxsystem NAD(P)/NAD(P)H gekoppelt sind. Je nach den zu bestimmenden Metaboliten verwendet man in bekannter Weise ATP-abhängige oder ATP-unabhängige Luciferase.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man einen Enzymcocktail mit einem Gehalt an Luciferase und gegebenenfalls wenigstens eines weiteren Enzyms, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er eine hochviskose Matrix und eine hohe Luciferasekonzentration enthält. Die bevorzugten Luciferasekonzentrationen sowie die bevorzugten Stoffe, um die Matrix hochviskos zu machen, wurden oben genannt. Drei besonders bevorzugte Enzymcocktails zur Bestimmung von Glucose, Lactat bzw. ATP werden folgendermaßen hergestellt:

#### Enzymcocktail zur Bestimmung von Glucose

25 A. Eine Grundlösung wird durch Auflösen von  
300 mg Gelatine  
150 mg Glycerin und  
150 mg Polyvinylpyrrolidon  
unter Erwärmung (ca. 70°C) im 2,5 ml 0,3 M Phosphatpuffer (pH = 7,0) erhalten.  
30 B. Sodann nach Abkühlen auf 30°C werden  
300 mg ATP in 1 ml Phosphatpuffer gelöst  
240 mg NADP in 1 ml Phosphatpuffer gelöst  
40 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
40 µl 65 mM Dithiothreitlösung  
400 µl 4 mM FMN-Lösung und  
60 µl 640 mM Decanal-Lösung in Methanol  
zugefügt, worauf der pH auf 7,0 eingestellt wird.  
C. Sodann werden  
40 150 µl Hexokinase- (EC 2.7.1.1, 1400 U/ml, 25°C) und  
150 µl Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Suspension  
(EC 1.1.1.49, 1750 U/ml, 25°C) abzentrifugiert, das Pellet  
in 0,5 ml Phosphatpuffer aufgenommen und der Grundlösung zugegeben.  
45 Luciferase- (EC 1.14.14.3, ca. 48 mU) und FMN-Oxidoreduktase-Lyophilisat (EC 1.6.8.1, ca. 40 U) werden in  
250 µl Phosphatpuffer aufgenommen und der Grundlösung zugegeben.  
D. Die fertige Lösung wird in Reaktionsgefäßchen portioniert und durch Lagerung bei -80°C eingefroren.

#### Enzymcocktail zur Bestimmung von Lactat

A. Eine Grundlösung wird durch Auflösen von  
300 mg Gelatine  
150 mg Glycerin und  
150 mg Polyvinylpyrrolidon  
unter Erwärmung (ca. 70°C) in 2,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit 50 mM Glutamat (pH = 7,0) hergestellt.  
B. Sodann werden nach Abkühlen auf 30°C  
500 mg NAD in 2 ml Phosphatpuffer gelöst  
40 µl 65 mM Dithiothreitlösung und  
40 µl 640 mM Decanal-Lösung in Methanol  
400 µl 4 mM FMN-Lösung  
zugefügt, der pH wird auf 7,0 eingestellt.  
C. Sodann werden  
400 µl Lactatdihydrogenase- (EC 1.1.1.27, 5500 U/ml, 25°C)

und 400  $\mu$ l Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Suspension (EC 2.6.1.2, 800 U/ml, 25°C) abzentrifugiert, das Pellet wird in 0,5 ml Phosphatpuffer aufgenommen und der Grundlösung zugefügt.

Luciferase- (EC 1.14.14.3, ca. 48 mU) und FMN-Oxidoreduktase-Lyophilisat (EC 1.6.8.1, ca. 40 U) werden in 250  $\mu$ l Phosphatpuffer aufgenommen und der Grundlösung zugefügt.

Die Stufe D wird wie oben ausgeführt.

#### Enzymcocktail zur Bestimmung von ATP

A. Eine Grundlösung wird durch Lösen von 300 mg Gelatine, 150 mg Glycerin und 150 mg Polyvinylpyrrolidon unter Erwärmen (ca. 70°C) in 2,5 ml 50 mM HEPES-Puffer hergestellt.

B. Sodann werden

40  $\mu$ l 0,5 M EDTA-Lösung

20  $\mu$ l 100 mM DDT-Lösung

100  $\mu$ l M MgCl<sub>2</sub>-Lösung

50  $\mu$ l Luciferase-Lösung (aus Photinus pyralis, EC 1.13.12.7, ca. 0,4 mU) in 0,5 M Tris-Acetat-Puffer (pH = 7,5) und

50  $\mu$ l D(-)-Luciferin-Lösung (aus Photinus pyralis, 10 mg/ml) in 0,1 M Tris-Acetat-Puffer (pH = 7,5) zugefügt.

Die Stufe C erfolgt wie oben die Stufe D.

Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besitzt ein Lichtmikroskop mit einer Trägerfläche für die Auflage der Gewebeprobe, einen Photonenzähler und eine Videokamera mit Bildprozessor. Erfindungsgemäß ist diese Vorrichtung gekennzeichnet durch eine Einrichtung zur Regelung der Temperatur der Trägerfläche und eine auf der Trägerfläche anzuordnende einseitig offene Gießform für das Einfrieren von Enzymlösung, wobei die Gießform derart dimensioniert ist, daß auf ihrer offenen Seite ein Trägerplättchen mit der Gewebeprobe angeordnet werden kann.

In der Zeichnung ist eine Vorrichtung nach der Erfindung in schematischer Weise dargestellt. Zur Verdeutlichung ist links von dieser Zeichnung eingekreist die Trägerplatte des Lichtmikroskops mit den darauf befindlichen Einrichtungen vergrößert dargestellt.

Das Lichtmikroskop 1 besitzt eine bezüglich der Temperatur regelbare Trägerplatte 2, auf welcher eine Gießform 3 gelagert ist. Diese enthält in ihrer mittigen becherförmigen Höhlung schwarz dargestellt einen Enzymcocktail 4, in den ein Gewebeabschnitt 6 eintaucht, welcher an dem Deckgläschen 5 befestigt ist. In der Zeichnung ist der Enzymcocktail in geschmolzener Form dargestellt.

In der Praxis wird eine definierte Menge an Enzymlösung in die Gießform aus Kunststoff oder anderem Material einpipettiert und als gleichmäßig dicke Schicht auf dem Boden der Gießform gefroren. Sodann wird die Gießform mit der eingefrorenen Enzymcocktailschicht auf die Trägerplatte des Lichtmikroskops gelegt. Anschließend wird auf die gefrorene Enzymcocktailschicht ein Deckgläschen mit dem Gewebeabschnitt nach unten gelegt, so daß eine Kontaktfläche zwischen dem Gewebeabschnitt und der Enzymschicht entsteht.

Nunmehr wird die Temperatur der Trägerplatte 2 erhöht und auf einem Wert konstant gehalten, der geringfügig über dem Taupunkt des Sandwiches 4/6 liegt. Bei Auftauen der Enzymcocktailschicht sinkt der Gewebeabschnitt in der in der Zeichnung dargestellten Form in

den flüssigen Enzymcocktail ein.

Über die Mikroskopoptik einen Photonenzähler 7 und eine Videokamera 8 wird der Sandwich betrachtet bzw. auf einem Bildschirm 9 abgebildet. Die Bildinformation wird dabei über einen Bildprozessor 11 mit einer variablen Integrationseinrichtung geführt und kann von dort aus in einem externen Rechner oder Massenspeicher weitergeleitet werden. Mit dem Bezugssymbol 10 ist die Tastatur der Vorrichtung bezeichnet.

10 Selbstverständlich müssen in bekannter Weise für jede zu untersuchende Substanz spezifische Enzymreaktionen vorhanden sein, die den betreffenden Stoff chemisch an die Lichtemission der Luciferase koppeln. Die erwähnt, kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Verteilung all derjenigen Metaboliten bestimmt werden, für die es eine solche Kopplung gibt.

Zur Verhinderung einer Kondensation von Luftfeuchtigkeit auf dem gekühlten Objekt kann zweckmäßig kühle trockene Luft durch eine Haube geleitet werden, die den Objektisch und die Mikroskopoptik umgibt.

Die Kalibrierung der Biolumineszenz kann folgendermaßen durchgeführt werden:

Die entstehende Lichtmenge der Biolumineszenzreaktion ist direkt von der in der zu untersuchenden Probe vorhandenen Substratmenge abhängig. Durch geeignete Standardproben mit bekannten Substratkonzentrationen kann daher eine Kalibrierung der Biolumineszenz durchgeführt werden. Hierdurch ist es möglich, von einer in einem zu untersuchenden Gewebeabschnitt gemessenen Lichtintensität auf die aktuelle Substratkonzentration zu schließen.

#### A. Herstellung der Standards

Als Grundsubstanz für die Standardproben dient Lebergewebe von jungen Schweinen. Die frisch gewonnene Leber wird dazu in ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten, mehrfach in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7,5) gewaschen und anschließend für 30 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Die Fertigstellung der Standardproben kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen:

##### A.1 Kalibrierung mit Gewebestücken

45 Die Gewebestücke werden für ca. 10 Tage in auf pH = 7,5 gepufferten Substratlösungen mit bekannten Konzentrationen inkubiert. Danach erfolgt das rasche Einfrieren des Gewebes in flüssigem Stickstoff. Die tatsächlich in den Gewebestückchen vorhandene Substratkonzentration ist mit herkömmlichen enzymatischen Verfahren zu bestimmen.

##### A.2 Kalibrierung mit Gewebehomogenat

55 Die gewaschenen und hitzeinaktivierten Gewebestücke werden in einem Mixer zerkleinert und anschließend in einem Homogenisator fein zermahlen. Der pH-Wert des so erhaltenen Gewebebreis wird mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Aliqots des Breis werden mit Substratlösungen bekannter Konzentration versetzt, in aus Aluminiumfolie geformte Töpfchen überführt und in flüssigem Stickstoff rasch tiefgefroren. Die tatsächlich im Homogenat vorhandene Substratkonzentration ist mit herkömmlichen enzymatischen Verfahren zu bestimmen.

## B. Durchführung der Kalibrierung

Die Anordnung und das Verfahren nach Anspruch 1 werden angewandt auf Cryostatschnitte aus den Gewebestückchen nach 6.A.1. bzw. aus den Homogenatblöcken nach 6.A.2. Dabei sind die unterschiedlichen Substratkonzentrationen der verschiedenen Standards der jeweiligen über den Gewebe- bzw. Homogenatschnitt gemittelten Biolumineszenz-Intensität direkt zuordnbar. Das wichtigste Kriterium zur Beurteilung der Standardgüte ist eine möglichst homogene Substratverteilung in den betreffenden Proben.

## Patentansprüche

15

1. Verfahren zur Bestimmung der örtlichen Verteilung von Metaboliten in Gewebeproben mittels Biolumineszenz durch Behandlung der Gewebeprobe mit Luciferase-Lösung und gegebenenfalls weiterer Enzymlösung und Auszählung der Photonen pro Flächeneinheit der Gewebeprobe mit Hilfe eines Photonenzählers und einer Videokamera, dadurch gekennzeichnet, daß man Enzymlösung mit einer hohen Luciferasekonzentration und mit einer hohen Viskosität verwendet. 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Enzymlösung mit einer Luciferasekonzentration von 0,1 bis 20,0 vorzugsweise von 8 bis 12 mU/ml verwendet. 30
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Enzymlösung mit einer gelartigen Matrix verwendet. 35
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Enzymlösung verwendet, die als hochviskos machenden Stoff Gelatine und/oder Polyvinylpyrrolidon enthält. 40
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Enzymlösung in gefrorener Form mit der Gewebeprobe in Berührung bringt und die Temperatur anschließend so erhöht, daß die Tautemperatur des so gebildeten Sandwiches gerade überschritten wird. 45
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Enzymlösung in Form eines in dünner Schicht gefrorenen Plättchens mit der Gewebeprobe in Berührung bringt. 50
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Enzymlösung in einer Gießform als dünne Schicht gefroren mit der Gewebeprobe in Berührung bringt. 55
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man mit Hilfe einer Bildprozessor-Integrationseinrichtung für die Punkte der Bildfläche mit variabler Zeitkonstante für die Photonauszählung einen bestimmten Zeitabschnitt während des gesamten Reaktionsablaufes herausgreift. 60
9. Enzymcocktail für die Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit einem Gehalt an Luciferase und wenigstens eines weiteren Enzyms, dadurch gekennzeichnet, daß er eine hochviskose Matrix und eine hohe Luciferasekonzentration enthält. 65
10. Enzymcocktail nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Luciferasekonzentration von 0,1 bis 20,0 vorzugsweise von 8 bis 12 mU/ml

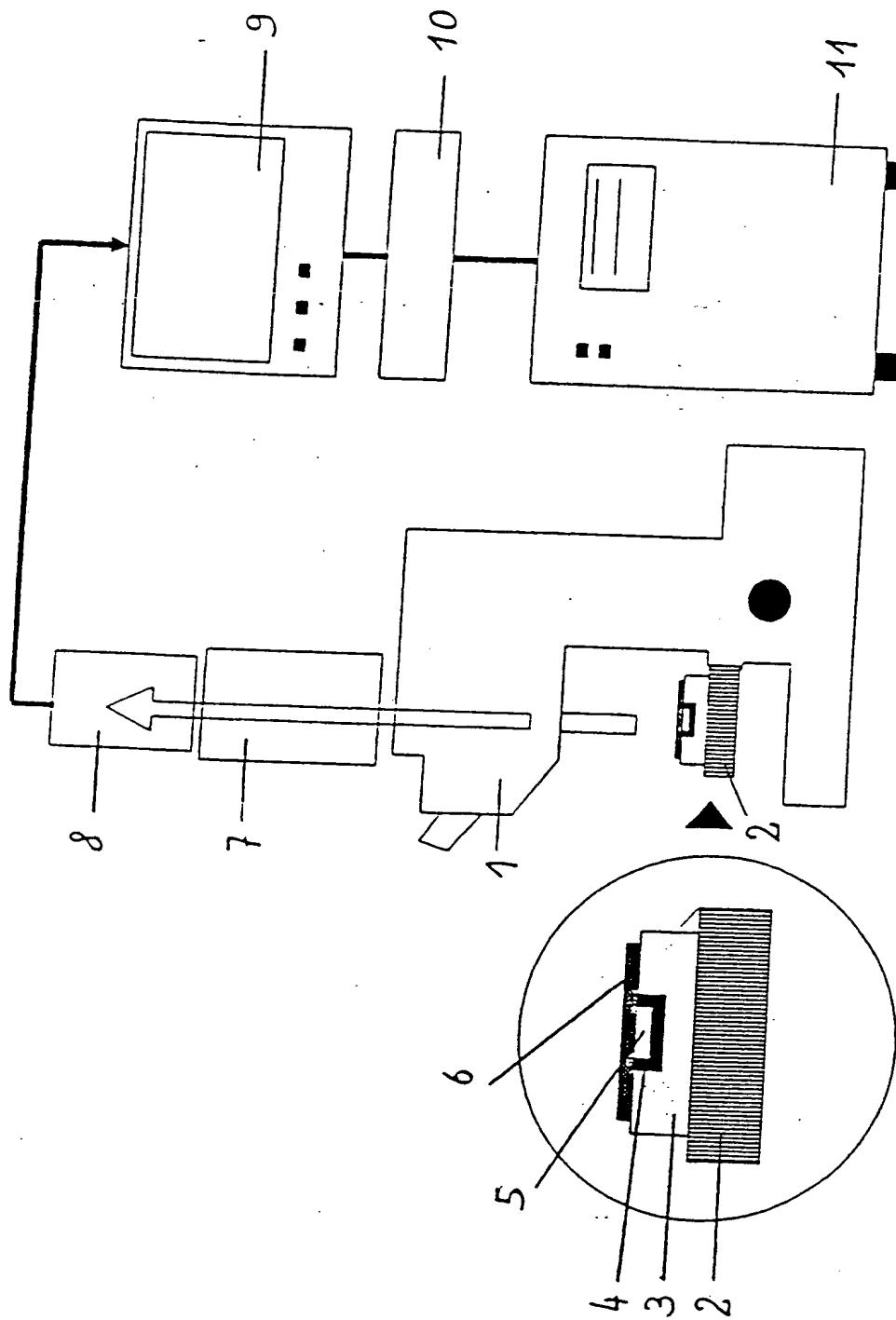
enthält.

11. Enzymcocktail nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine gelartige Matrix enthält.
12. Enzymcocktail nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß er als hochviskos machenden Stoff Gelatine und/oder Polyvinylpyrrolidon enthält.
13. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit einem Lichtmikroskop mit einer Trägerfläche für das Auflegen der Gewebeprobe, mit einem Photonenzähler und mit einer Videokamera mit Bildprozessor, gekennzeichnet durch eine Einrichtung zur Regelung der Temperatur der Trägerfläche und eine auf der Trägerfläche anzuordnende einseitig offene Gießform für das Einfrieren von Enzymlösung, wobei die Gießform derart dimensioniert ist, daß auf ihrer offenen Seite ein Trägerplättchen mit der Gewebeprobe angeordnet werden kann.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, gekennzeichnet durch eine wenigstens die Trägerfläche und die Mikroskopoptik umgebende Haube sowie eine Vorrichtung zur Einführung kühler trockener Luft in diese Haube.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**